Aus der Universitäts-Kinderklinik Marburg an der Lahn
(Direktor: Prof. Dr. F. Linneweh)

Die Ausscheidung einzelner C_{19}- und C_{21}-Steroide im Harn von Frühgeborenen unter besonderer Berücksichtigung von Hyperbilirubinaemie und Alter

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Klaus Zimmermann
aus Berlin

Marburg 1969

Fotodruck: Erich Mauersberger, Marburg

Aus der Universitäts-Kinderklinik Marburg an der Lahn
(Direktor: Prof. Dr. F. Linneweh)

Die Ausscheidung einzelner C_{19}- und C_{21}-Steroide im Harn von Frühgeborenen unter besonderer Berücksichtigung von Hyperbilirubinaemie und Alter

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Klaus Zimmermann
aus Berlin

Marburg 1969

Fotodruck: Erich Mauersberger, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 21.7.1969
gedruckt mit Genehmigung der Fakultät
Dekan: Professor Dr.rer.nat. P. Karlson
Referent: Professor Dr.med. W. Teller
Correferent: Professor Dr.med. R. Buchholz

Inhaltsverzeichnis Seite

I. Einleitung 1

Vorbemerkungen 2

Die Nebennierenrindenaktivität bei Neugeborenen 2

Der Einfluß von Steroidhormonen auf Glucuronsäure-Konjugationsmechanismen beim Neugeborenen 3

II. Eigene Fragestellung 7

III. Material und Methode 7

Untersuchungsgut 7

Chemikalien 9

Materialien 10

Methode der Steroidbestimmung 11

Beschreibung methodischer Einzelheiten 12

Typische Elutionsdiagramme 22

IV. Ergebnisse 23

11-Oxy-C_{19}-Steroide 24

11-Deoxy-C_{19}-Steroide 25

C_{21}-Steroide 26

V. Diskussion 30

VI. Zusammenfassung 33

VII. Literatur 35

I. E i n l e i t u n g

Die Kenntnisse über den Steroidstoffwechsel im Kindesalter, besonders im frühen Säuglingsalter, sind noch lückenhaft. Teilweise hängt dies mit der geringen Steroidausscheidung in diesem Lebensalter zusammen. Erst die Entwicklung von Mikromethoden ermöglichte eine Untersuchung der Steroidausscheidung im frühen Lebensalter mit quantitativer Analyse einzelner Steroidmetaboliten.

Das Steroidmuster bei Frühgeborenen ist noch so gut wie unbekannt. Bei einem großen Teil der ausgeschiedenen Steroide handelt es sich um noch nicht näher identifizierte Substanzen.

Bezüglich der Interpretation von Steroidausscheidungen bei Neu- und Frühgeborenen bestehen Schwierigkeiten wegen der möglichen plazentaren Herkunft. Weiterhin wurde in den letzten Jahren der Einfluß anderer, vor allem mütterlicher Steroide, auf Konjugation und Stoffwechsel bestimmter Substanzen, z.B. Bilirubin, bei Neugeborenen diskutiert.

In der vorliegenden Arbeit soll versucht werden, durch die Bestimmung einzelner C_{19}- und C_{21}-Steroide im Harn von Frühgeborenen verschiedenen Alters mit und ohne Hyperbilirubinaemie einen Beitrag zum Steroidstoffwechsel in dieser Altersgruppe zu liefern.

V o r b e m e r k u n g e n

Die Nebennierenrindenaktivität bei Neugeborenen.

Die Nebenniere erfährt zur Zeit der Geburt eine größere Umwandlung. Bei Neugeborenen macht die Nebennierenrinde etwa 85 % der Nebenniere aus (SWINYARD, 1943). Es wird diskutiert, ob diese Hypertrophie durch fetales ACTH hervorgerufen sein kann (JOST, 1959, LANMAN, 1961). Die fetale Nebennierenrinde ist bereits mit den für die Steroidsynthese erforderlichen Enzymsystemen ausgestattet. Allerdings bestehen quantitative Unterschiede zur Nebennierenrinde der Erwachsenen. Es wurde eine relative Schwäche der 3β-Hydroxysteroiddehydrogenase und der Δ^5-Δ^4-Isomerase nachgewiesen (VILLEE et al., 1959, BLOCH u. BENIRSCHKE, 1962). Aus diesem Grund werden mehr Δ^5-Steroide (Dehydroepiandrosteron, Pregnenolon u.a.) produziert als Δ^4-Steroide (Cortisol, Corticosteron, Progesteron u.a.). Die geringe Cortisol-Produktion stimuliert die fetale Hypophyse zur vermehrten Bildung von ACTH, das möglicherweise die Hypertrophie der fetalen Nebennierenrinde bewirkt. Nach der Geburt wird die Cortisol-Produktion in der permanenten Außenzone der Nebennierenrinde aufgenommen. Die fetale Innenzone nimmt an Umfang ab, während die Außenzone eine starke Größenzunahme erfährt.

Der Einfluß von Steroidhormonen auf Glucuronsäure-Konjugationsmechanismen beim Neugeborenen.

Die Voraussetzung für die Ausscheidung verschiedener lipophiler Substanzen im Urin ist ihre Koppelung mit Glucuronsäure. Für diesen Mechanismus sind mehrere Enzyme notwendig:

1) Uridin-Triphosphat(UTP) + Glucose-1-Phosphat (G-1-P) —Pyrophosphat-Uridyl-Transf.→ Uridin-Diphosphat-Glucose (UDPG) + Pyrophosphat

2) UDPG + 2-Diphosphopyridinnucleotid(NAD) —Uridyl-Dehydrogenase→ Uridin-Diphosphat-Glucuronsäure(UDPGS) + 2 NADH + 2 H

3) UDPGS + Bilirubin bzw. anderer Glucuronsäureacceptor —Glucuronyl-Transferase→ Bilirubin-Glucuronid + Uridin-Diphosphat (UDP)

Andere Glucuronsäure-Acceptoren sind z.B. Steroide, Schilddrüsenhormone, Salicylsäure, Sulfonamide, Chloramphenicol, Vitamin K und andere Substanzen.

Es wurde festgestellt, daß zur Zeit der Geburt die Aktivität der Glucuronyl-Transferase relativ gering ist. Beim menschlichen Feten fand man im Gegensatz zu Rattenfeten (SCHRÖTER, 1965, BROWN et al, 1958) ein völliges Fehlen der Aktivität. Bei Reifgeborenen soll nach etwa 15-2o Lebenstagen die Aktivität des Erwachsenen erreicht sein. Gleichzeitig mit der Glucuronyl-Transferase steigt auch die Aktivität der Uridyl-Dehydrogenase an, die die notwendige aktivierte Glucuronsäure bereitstellt.

Von mehreren Autoren wurde über eine Hemmung der Glucuronyl-Transferase und eine dadurch ausgelöste Hyperbilirubinaemie berichtet. Es handelt sich um in-vitro und in-vivo Versuche. ARIAS et al. (1963, 1964) berichteten über mehrere Fälle von Hyperbilirubinaemie, die durch Muttermilchernährung induziert worden waren. Nach Absetzen der Muttermilchernährung konnte ein Abfall des Bilirubinspiegels beobachtet werden. Die Milch dieser Frauen hemmte die Bildung von o-Aminophenol-Glucuronid, während die Milch anderer Frauen nur eine geringfügige Hemmwirkung aufwies. Es konnte der Nachweis von Pregnan-3α, 20β -diol in der Ikterus-bewirkenden Muttermilch geführt werden. Dieses Steroid wurde für die Hemmung der Glucuronyl-Transferase verantwortlich gemacht.
Bei sehr jungen Säuglingen, 6 bzw. 8 Tage alt, konnte durch orale Gaben von Pregnan-3α, 20β -diol ein Anstieg des Serum-Bilirubins erreicht werden. Bei älteren Säuglingen zeigte die orale Gabe des Steroids keinen Anstieg des Bilirubinspiegels, da in diesem Lebensalter die niedrige Enzymaktivität des frühen Neugeborenenstadiums nicht mehr vorliegt.
Von anderen Autoren wurden diese Befunde bestätigt (STIEHM, RYAN, 1965, KRAUER-MAYER, 1968).
Die Herkunft des Pregnan-3α, 20β -diols ist noch unbekannt, da normalerweise das Isomer, Pregnan-3α, 20α -diol als Hauptmetabolit des Progesterons in Urin und Milch ausgeschieden wird. In normaler Muttermilch kommt Pregnan-3α, 20β -diol nicht vor.

Weiterhin wurde von verschiedenen Autoren über in-vitro Versuche der Glucuronyl-Transferase-Hemmung durch Steroide berichtet (HSIA et al, 1960, 1963, LATHE and WALKER, 1958, 1963, JONES, 1964). Die größte Hemmwirkung der Bilirubin- bzw. o-Aminophenol-Konjugation wurde durch Pregnan-3α, 20β-diol bewirkt. Andere Autoren (LAURITZEN und LEHMANN, 1966, SILVERBERG, 1964, 1966, LEWI, 1964) haben den von ARIAS et al (1963, 1964) als Ursache der Entstehung der Hyperbilirubinaemie bei Neugeborenen angegebenen Faktor angezweifelt oder ihm nur eine untergeordnete Rolle für die Ätiologie zugeschrieben. LAURITZEN und LEHMANN (1966) nehmen eine kompetitive Verdrängung des Bilirubins durch Steroide an, die bevorzugt durch die Glucuronyl-Transferase mit der Glucuronsäure gekoppelt werden. Große Hormonmengen werden dem Neugeborenen durch die Muttermilch zugeführt, die durch die Glucuronyl-Transferase konjugiert werden müssen. Durch orale Gaben von Oestriol (10 mg), Pregnanediol (10 mg) und Cortison (12,5 mg) an Neugeborene stieg der Bilirubinspiegel im Blut der Neugeborenen an. Auch die orale Gabe der Steroide an die Mutter führte zu einem Bilirubinspiegelanstieg bei den Neugeborenen, da die Steroide mit der Muttermilch auf die Neugeborenen übergingen. Progesterongaben führten nur dann zu einem Bilirubinanstieg beim Neugeborenen, wenn sie der Mutter gegeben wurden, da es als Pregnanediol auf das Kind übergeht. Progesteron kann vom Kind nicht umgebaut und nicht konjugiert werden. Weiterhin wird angenommen, daß durch den Geburtsstress eine vermehrte

Corticosteroid-Ausscheidung beim Neugeborenen bedingt wird, was zu einer starken Belastung der niedrigen Glucuronyl-Transferase-Aktivität führt.(LAURITZEN und LEHMANN, 1967).

II. Eigene Fragestellungen

1. Wie ist das normale Steroidmuster im Harn bei Frühgeborenen verschiedenen Alters ?
2. Haben Frühgeborene mit Hyperbilirubinaemie ein anderes Steroidmuster im Vergleich zu alters- und geschlechtsmäßig entsprechenden nicht-ikterischen Frühgeborenen ?
3. Bestehen Unterschiede zwischen dem Steroidmuster von Frühgeborenen, Reifgeborenen und älteren Säuglingen ?

III. Material und Methode

Untersuchungsgut:

1. Frühgeborene:

Es wurde eine Einteilung der Frühgeborenen in 8 Gruppen vorgenommen.

Gruppe 1a: 6 weibliche, normale Frühgeborene, 4. - 6. Lebenstag, Gewicht zwischen 1740 und 1840 g, Bilirubin bis 9,4 mg%.

Gruppe 1b: 3 weibliche, normale Frühgeborene, 9. - 12. Lebenstag, Gewicht zwischen 1850 und 2130 g, Bilirubin bis 8,3 mg%.

Gruppe 2a: 3 weibliche Frühgeborene mit Hyperbilirubinaemie, 3. - 5. Lebenstag, Gewicht zwischen 1730 und 1970 g, Bilirubin zwischen 17,6 und 22,4 mg%.

Gruppe 2b: 3 weibliche Frühgeborene mit Hyperbilirubin-

aemie, 12. - 14. Lebenstag, Gewicht zwischen 1360 und 1980 g, Bilirubin zwischen 15,5 und 19,8 mg%.
Gruppe 3a: 6 männliche, normale Frühgeborene, 4. - 5. Lebenstag, Gewicht zwischen 1720 und 1960 g, Bilirubin bis 12,0 mg%
Gruppe 3b: 6 männliche, normale Frühgeborene, 10. - 13. Lebenstag, Gewicht zwischen 1470 und 2100 g, Bilirubin bis 12,5 mg%.
Gruppe 4a: 6 männliche Frühgeborene mit Hyperbilirubinaemie, 3. - 5. Lebenstag, Gewicht zwischen 1380 und 1940 g, Bilirubin zwischen 17,7 und 22,8 mg%.
Gruppe 4b: 3 männliche Frühgeborene mit Hyperbilirubinaemie, 9. - 12. Lebenstag, Gewicht zwischen 1790 und 2100 g, Bilirubin zwischen 19,3 und 20,0 mg%.

Die Grenze des physiologischen Icterus wurde bei 13 mg% angenommen.
Bei allen Fällen mit Hyperbilirubinaemie bestanden keine Inkompatibilitäten im ABO- bzw. Rh-System. Es handelte sich immer um eine sogenannte Frühgeborenen-Hyperbilirubinaemie. Da die Steroidausscheidung in diesem frühen Lebensalter nur minimal ist, wurden in jeder Gruppe die Urine von 3 Frühgeborenen zusammen untersucht.

Gruppe 5a: 2 weibliche, reife Neugeborene, Alter 20 Tage.
Gruppe 5b: 2 männliche, reife Neugeborene, Alter 21 Tage.
Gruppe 6a: 6 ältere, weibliche Säuglinge, Alter 1-4 Monate.
Gruppe 6b: 6 ältere, männliche Säuglinge, Alter 1-6 Monate.

Chemikalien:

Ketodase (Warner-Cilcott, Morris Plains, N.J./USA)
Eisessig (96%) p.a. (Merck)
Natrium-Acetat p.a. (Merck)
Tetrachlorkohlenstoff, p.a. (Merck) oder re-destilliert über Kaliumcarbonat, p.a. (Merck)
Methylendichlorid, p.a. (Merck) oder re.-destilliert über Kaliumcarbonat, p.a. (Merck)
Schwefelsäure (95-97%), p.a. (Merck)
Aethylacetat, p.a. (Merck) oder re-destilliert über Kaliumcarbonat, p.a. (Merck)
Natriumchlorid, krist. (Merck)
o,1 n Natriumhydroxydlösung
o,o5 n Natriumhydroxydlösung
5%ige Natriumhydroxydlösung
1o%ige Natriumhydroxydlösung.
Natriumsulfat, wasserfrei (Merck)
Kaliumhydroxyd, Plätzchenform, reinst (Merck)
Florisil (Floridin Company, Tallahassee, Florida/USA) 6o/1oo mesh, mehrmals in destilliertem Aethanol gewaschen, getrocknet und kurz vor Gebrauch 1 Stunde im Muffelofen bei 6oo Grad aktiviert.
Chloroform, frisch destilliert über Kaliumcarbonat, p.a. (Merck)
Methanol, p.a. (Merck)
Aethanol (96%) (Riedel-de Haen)
Ligroin (Sdp. 9o - 1oo Grad C.) (Riedel-de Haen)

Toluol, p.a. (Merck)

Isooctene (2,4,4 - Trimethylpenten) 95%ig (Fluka) bei 1oo Grad destilliert und einmal durch Silicagelsäule filtriert.

1,3-Dinitrobenzol zur Bestimmung der 17-Ketosteroide (Merck)

Tetrazoliumblauchlorid, Standard Fluka

Aethanol abs. (Riedel-de Haen)

Phenylhydraziniumchlorid, p.a. (Merck)

Materialien:

Chromatographierohre mit Glas- oder Teflonbahn, 1 cm Durchmesser, zugespitzter Auslauf, G3-Fritte, etwa 4 cm oberhalb des Glashahnes zugeschmolzen.

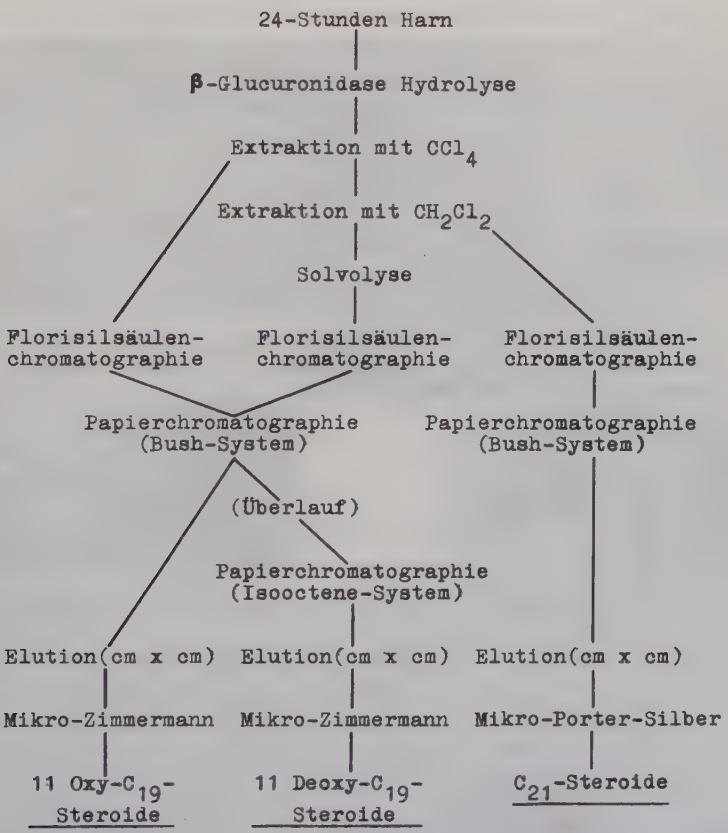
Chromatographiepapiere: Schleicher-Schüll 1o43a (für 17-Ketosteroide mit Methanol gewaschen).

Thermokonstanter Chromatographieschrank.

Thermokonstantes Wasserbad mit Deckel.

Methode der Steroidbestimmung

Schema des Aufarbeitungsvorgangs:



Beschreibung methodischer Einzelheiten.

Die Urinsammlung erfolgte entweder auf einem Stoffwechselbett oder mit einem Urinsammler (Sammelbeutel der Fa. Heinze KG, Bonn).

Legende: Stoffwechselmatratze für Säuglinge (Anfertigung nach eigenen Angaben durch Fa. Holzhauer, Sanitätshaus Marburg a. d. Lahn)

Zur Konservierung wurden dem Urin bei der Sammlung 2 ml Toluol zugesetzt. Bis zur Aufarbeitung wurde der Urin in einer Tiefkühltruhe bei -25° C eingefroren.

Wegen der geringen Steroidausscheidung wurden bei den Frühgeborenen 3 Urine der gleichen Gruppe zusammen untersucht. Vor der Aufarbeitung wurde das Toluol abgetrennt.

Für die Hydrolyse wurde der Urin nach Zugabe von 1 Teelöffel Na-Acetat mit Eisessig auf pH 5,0 eingestellt und mit 1/17 Vol. Ketodase (300 Eβ -Glucuronidase/ml) versetzt. Nach Umschütteln wurde der Urin 72 Stunden bei 37° C inkubiert.

Danach erfolgte die Extraktion 3x mit der gleichen Menge Tetrachlorkohlenstoff unter Schütteln im Scheidetrichter. Auftretende Emulsionen wurden durch Zentrifugieren bei 3000 U/min. in organische und wässrige Phase getrennt. Die organischen Phasen der CCl_4-Extrakte wurden im Rotationsverdampfer bei einer Temperatur unter 50° C auf ein Volumen von 500 ml eingeengt.

Anschließend wurde der CCl_4-Extrakt 2x mit 1/20 Vol. 0,1 n NaOH und weiter mehrmals mit 1/20 Vol. H_2O dest. bis zur neutralen Reaktion gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und im Rotationsverdampfer vollständig eingedampft = Extrakt 1 (C_{19}-Steroid-Glucuronide). Der wässrige Rückstand des CCl_4-Extraktes wurde 3x mit dem 1,5 fachen Volumen Methylendichlorid im Scheidetrichter extrahiert. Die organische Phase wurde im Rotationsverdampfer auf 500 ml eingeengt, dann 2x mit 1/20 Vol. 0,05 n NaOH und weiter mehrmals mit 1/20 Vol. H_2O dest.

bis zur neutralen Reaktion gewaschen. Die NaOH-Waschwässer wurden mit je 5o ml CH_2Cl_2 reextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und im Rotationsverdampfer vollständig eingedampft = Extrakt 2 (C_{21}-Steroide). Zur Solvolyse wurde die wässrige Phase des CH_2Cl_2-Extrakts mit konzentrierter Schwefelsäure auf pH o,5 eingestellt, mit o,2g x Vol.NaCl versetzt und 2x mit dem gleichen Volumen Aethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde über Nacht bei 37° C inkubiert. Anschliessend erfolgte Einengen des Extraktes im Rotationsverdampfer auf 5oo ml, 2maliges Waschen mit 1/2o Vol. 5%iger NaOH und mehrmals mit 1/2o Vol.H_2O dest. bis zur neutralen Reaktion. Nach Trocknen über Na_2SO_4 wurde der Extrakt im Rotationsverdampfer vollständig eingedampft = Extrakt 3 (C_{19}-Steroid-Sulfate). Zur Säulenchromatographie wurden die Säulen 1o cm hoch mit Florisil gefüllt, das in dest. Chloroform aufgeschwemmt war. Vorher war das Florisil bei 6oo° C aktiviert worden. Die eingetrockneten Extrakte wurden in wenigen ml Chloroform aufgenommen und auf die Säule aufgetragen. Zur Entfernung des Methanol-Zusatzes musste das Chloroform kurz vor der Verwendung über Kaliumcarbonat destilliert werden.

Schema der Elution:

Extrakt 1 und 3: (C_{19}-Steroide)	a)	5o ml Chloroform
	b)	1oo ml 3% Methanol in Chloroform
	d)	5o ml 1oo% Methanol
Extrakt 2: (C_{21}-Steroide)	a)	5o ml Chloroform
	b)	5o ml 2% Methanol in Chloroform
	c)	1oo ml 25% Methanol in Chloroform
	d)	5o ml 1oo% Methanol

Die verschiedenen Fraktionen wurden in 100 ml Standkolben aufgefangen und unter Luftstrom bei konstanter Temperatur (42° C) eingedampft.

Die Fraktionen wurden anschließend mit Aethanol quantitativ in 5 ml Meßkölbchen (Extrakt 1 und 3) bzw. 10 ml Meßkölbchen (Extrakt 2) überführt.

Mit aliquoten Teilen (1a = 1 ml, 1b = 0,1 ml, 1d = 0,5 ml. 3a = 1 ml, 3b = 0,2 ml, 3d = 0,5 ml. 2b = 2 ml, 2c = 0,1 ml, 2d = 2 ml.) wurde eine Gesamt 17-Ketosteroid- bzw. Gesamt-Porter-Silber-Bestimmung (C_{21}-Steroide) durchgeführt. Da die Hauptmenge der Steroide sich in der 1b, 3b und 2c Fraktion befand, wurden nur diese Fraktionen zur Papierchromatographie verwendet. Da die d-Fraktionen auch einige Male einen hohen Steroidgehalt aufwiesen, wurden versuchsweise Papierchromatogramme dieser Fraktionen angefertigt. Auf Grund der mitlaufenden Vergleichssubstanzen konnten keine der unten aufgeführten bekannten Steroide festgestellt werden. Es handelte sich mit größter Wahrscheinlichkeit um unbekannte Steroide bzw. Zimmermann-positive Substanzen, die keine Steroidmetabolite sind.

Die Papierchromatographie wurde mit folgenden Systemen durchgeführt:

11-Oxy-C_{19}-Steroide (Bush-System): Ligroin:Toluol:Methanol: Wasser = 400:200:225:75

11-Deoxy-C_{19}-Steroide (Eberlein-Bongiovanni-System): Isooctan:Methanol:Wasser = 100:80:20

C_{21}-Steroide (Bush-System): Toluol:Methanol:Wasser = 300:75:25

Für die Durchführung der 17-Ketosteroid-Chromatographie

wurde gewaschenes Chromatographiepapier rechenförmig in drei 5,5 cm breite Streifen geschnitten, die an einem Ende aneinanderhingen. Mit wenigen Tropfen Aethanol abs. wurden die in einem Reagenzglas zusammen eingedampften Extrakte 1b und 3b wieder aufgelöst und mit einer Glaskapillare auf die Auftragslinie des Chromatographiestreifens aufgetragen. Das aufgetragene Material wurde ständig durch einen warmen Luftstrom getrocknet.
Um gute Ergebnisse zu erzielen, wurden auf einen Streifen höchstens 1000 µg Zimmermann-positiven Materials aufgetragen. Zum Vergleich wurden auf dem Mittelstreifen 4 in Reinsubstanz vorliegende 11-Oxy-C_{19}-Steroide aufgetragen: 11-OHA, 11-OHÄ, 11-OA, 11OÄ (Abkürzungen s. S. 23).
Über Nacht sättigten die Chromatogramme bei 37° C in runden Tanks. Die Entwicklung war absteigend: die Laufzeit betrug durchschnittlich 7 Stunden. Die Laufzeit musste bei jeder Papiercharge neu bestimmt werden. Die Überläufe wurden in kleinen Bechergläsern aufgefangen.
Die abgeschnittenen Vergleichsstreifen wurden nach Lufttrocknung mit "Zimmermann-Reagenz" angefärbt (200 mg m-Dinitrobenzol, gelöst in 10 ml Aethanol (96%) + 7 gr KOH-Plätzchen, gelöst in 50 ml Aethanol (96%). Von beiden Lösungen wurden gleiche Teile in einer Färbeschale gemischt, die Chromatogramm-Streifen durchgezogen und mit einem Föhn getrocknet.
Der Überlauf der 11-Oxy-C_{19}-Chromatogramme wurde mit dem Steroidmaterial, das weiter als 11-Ketoandrosteron

gelaufen und quantitativ mit Aethanol/Methanol aus dem Chromatogramm unterhalb der 11-OA-Zone eluiert worden war, vereinigt und in 5 ml-Kölbchen überführt. Nach einer Gesamtbestimmung mit 0,1 ml wurden 100-200 µg Zimmermann-positiven Materials in der oben beschriebenen Weise auf 2 cm breite Chromatogrammstreifen aufgetragen. Als Vergleiche dienten Androsteron, Aetiocholanolon und Dehydroepiandrosteron in Reinsubstanz. Die weitere Behandlung erfolgte wie oben angegeben, die Laufzeit betrug 5 Stunden. Nach Lufttrocknung wurden die Vergleichsstreifen wie oben angefärbt.

Für die Chromatographie der C_{21}-Steroide wurden 150-200 µg des E2c-Extraktes auf 2 cm breite Chromatographiestreifen aus nicht gewaschenem Papier in der obigen Weise aufgetragen. Als Vergleiche dienten Tetrahydrocortison (THE) und Tetrahydrocortisol (THF) in Reinsubstanz. Die weitere Behandlung erfolgte wie oben angegeben. Die Laufzeit betrug 42 Stunden. Nach Lufttrocknung wurden die Vergleichsstreifen mit Tetrazoliumblau-Reagenz angefärbt (25 mg Blautetrazolium, gelöst in 10 ml H_2O + 10 ml 10%ige NaOH-Lösung). Die Chromatogramm-Streifen wurden durch die Färbelösung hindurchgezogen, mit Leitungswasser gespült und an der Luft getrocknet.

Die Elution der aufgetrennten Steroide erfolgte bei den 11-Oxy-C_{19}-Steroiden, 11-Deoxy-C_{19}-Steroiden und den C_{21}-Steroiden in der gleichen Weise. Die Chromatogramm-Streifen wurden in 1 cm breite Streifen geschnitten. Das Elutionsgestell bestand aus in einer Reihe angeordneter

1o ml-Glasspritzen mit Injektionsnadeln, die am unteren Ende hakenförmig umgebogen waren. Die einzelnen Papierabschnitte wurden an den Nadelspitzen mit Pinzetten aufgehängt. Die Elution erfolgte 4 mal mit je 1 cm^3 einer Methanol-Aethanol Mischung 1:1.

Bei den C_{19}-Steroiden wurde die steroidhaltige Lösung in 1o x 75 mm-Reagenzgläsern aufgefangen und im Wasserbad bei konstanter Temperatur unter Luftstrom eingedampft.

Die Elutionslösung der C_{21}-Steroide wurde in 5 ml Kölbchen aufgefangen. Vom Inhalt der Kölbchen wurden 2x2 ml in 12 x 75 mm-Reagenzgläser pipettiert und diese im thermokonstanten Wasserbad unter Luftstrom eingedampft.

Die Messung erfolgte mit der Mikro-Zimmermann-Methode. Lösungen: 5n Kaliumhydroxydlösung und 1%ige alkoholische m-Dinitrobenzollösung. In jedes Reagenzglas der C_{19}-Steroid-Elutionsserien wurden mit Hilfe einer Mikrobürette (Mikrometic Instrument Co, Cleveland/Ohio/USA) o,o8 ml der 1%igen m-Dinitrobenzollösung pipettiert. 2 Leerwerte und 2 5 µg Androsteron enthaltende Reagenzgläser wurden ebenfalls mit o,o8 ml der 1%igen m-Dinitrobenzollösung beschickt. Anschliessend wurde in jedes Reagenzglas o,o4 ml der 5n-KOH-Lösung mit der gleichen Bürette pipettiert. Der Inhalt der Reagenzgläser wurde sorgfältig gemischt, in lichtundurchlässige Glashülsen versenkt und 1o5 Min. im Wasserbad bei 25° C inkubiert. Da der entstehende Farbkomplex nicht konstant ist, wurden pro 5 Minuten 6 Proben auf diese Weise behandelt.

Nach der Inkubation wurden die Röhrchen aus den Glashülsen genommen. Nach Zugabe von 1 ml Aethanol (96%) pro Röhrchen und sorgfältiger Durchmischung auf einem Vortexmischer (Scientific Industries, Queens Village, N.Y./USA) wurde der Inhalt in Mikro-Küvetten (10 x 75 mm) überführt und im Coleman jr.-Spektrometer bei einer Wellenlänge von 520 mμ gegen 96%iges Aethanol gemessen. Das arithmetische Mittel der beiden Leerwerte wurde vom Meßwert abgezogen. Die Berechnung der 17-KS-Menge erfolgte an Hand einer Eichkurve mit 1-20 μg Androsteron (1 μg $\hat{=}$ 0,028 Extinktion).

Die Messung der C_{21}-Steroide erfolgte mit der Mikro-Porter-Silber-Methode.

Lösungen: Reagenz 1: 8 ml Aethanol werden mit 12 ml einer 60%igen H_2SO_4-Lösung gemischt. Reagenz 2: In 12 ml des Reagenz 1 werden 11,5 mg Phenylhydrazin-HCL gelöst.

Von den beiden Reagenzgläser-Reihen wurde die eine mit 0,8 ml Reagenz 1 und die andere mit 0,8 ml Reagenz 2 beschickt, sorgfältig gemischt und etwa 15 Stunden im Dunkeln stehen gelassen.

Die Messung erfolgte in Mikro-Küvetten im Photometer Eppendorf bei Filter Hg 405 mμ. Der Meßwert (Reagenz 2) wurde gegen den Blindwert (Reagenz 1) gemessen.

Die Ausrechnung erfolgte an Hand einer Eichkurve mit 1-10 μg Hydrocortison (1 μg $\hat{=}$ 0,05 Extinktion).

Um den Gesamtgehalt eines 1 cm-Abschnittes des Chromatogramms an C_{21}-Steroiden zu erhalten, mußten die Meßwerte mit 2,5 multipliziert werden.

Chromogenität und Umrechnungsfaktoren einzelner Steroide:

Jedes Steroid wurde in Reinsubstanz auf die Stärke seiner Farbentwicklung hin geprüft. Die Chromogenität von Androsteron und Hydrocortison wurde mit 1 angenommen und zu derjenigen der übrigen Steroide in Beziehung gesetzt.

Mikro-Zimmermann

	Chromogenität	Umrechnungsfaktor
Androsteron	1,0	
Aetiocholanolon	1,1	
Dehydroepiandrosteron	1,07	
11β-Hydroxyandrosteron	0,81	1,23
11β-Hydroxyaetiocholanolon	0,76	1,30
11-Ketoandrosteron	1,17	0,86
11-Ketoaetiocholanolon	1,25	0,80

Mikro-Porter-Silber

Hydrocortison	1,0
Tetrahydrocortison	0,9
Tetrahydrocortisol	0,92

Nur die Werte der 11-oxygenierten 17-Ketosteroide wurden bezüglich ihrer Chromogenität korrigiert; bei den übrigen Steroiden wurde darauf verzichtet, da die Schwankungen der Farbintensität weniger als 10% der Bezugssubstanz betrugen.

Für die Auswertung wurden die Ergebnisse der Meßreihen graphisch dargestellt: Ordinate: Steroid-Mengen in µg, Abszisse: cm - Nummer des Chromatogramms.

Durch die auf den Vergleichsstreifen mitlaufenden Reinsubstanzen konnten die einzelnen Steroide lokalisiert werden. Durch Addition der einzelnen µg-Werte jedes Zenti-

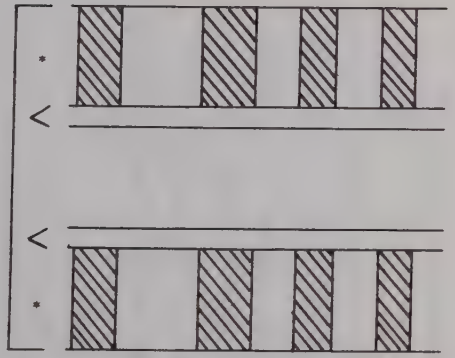
meters des Chromatogramms wurde nach Abzug des Nullwertes die absolute Menge der einzelnen Steroidgipfel ermittelt. Bei unvollständiger Trennung liessen sich durch das Differenzverfahren nach Bush (1961) die Steroidmengen der Zonen zwischen zwei Gipfeln anteilig den beiden daneben liegenden Gipfeln zurechnen.

Bei der Berechnung der Gesamtwerte musste ausser dem Umrechnungsfaktor noch berücksichtigt werden, ob der gesamte 24 Std.-Urin zur Aufarbeitung bzw. nur ein gewisser Teil des Steroidmaterials zur Auftragung gelangte.

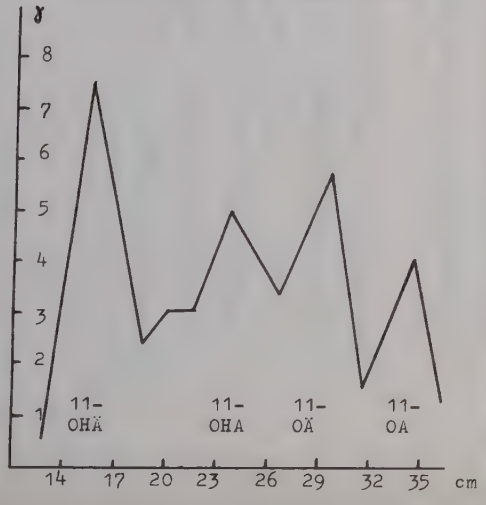
Zur Erläuterung sind abschliessend einige typische Elutionsdiagramme mit den dazugehörigen Chromatogrammen der angefärbten Vergleichsstreifen wiedergegeben (die Chromatogramme wurden im Maßstab 1:2,5 verkleinert und verkürzt aufgezeichnet).

Typische Elutionsdiagramme mit den dazugehörigen Chromatogrammen der reinen Vergleichssteroide

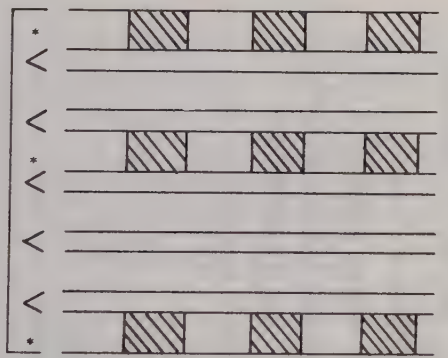
11-Oxy-C_{19}-Steroide



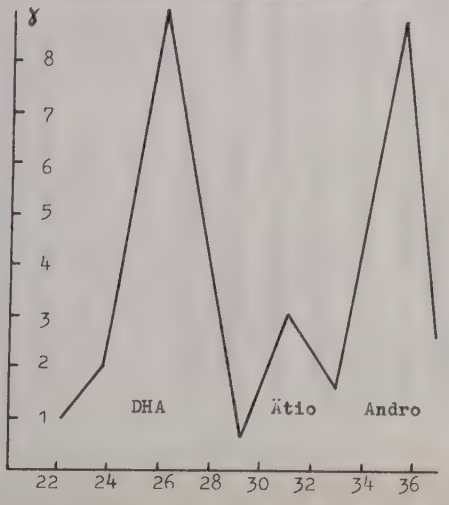
* angefärbte Vergleichsstreifen



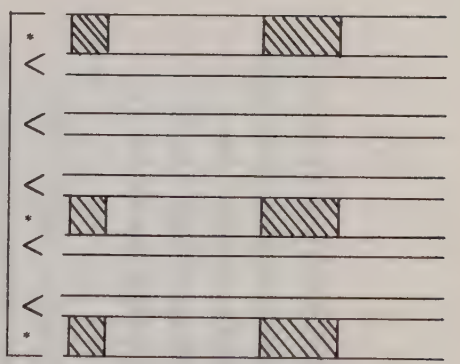
11-Deoxy-C_{19}-Steroide



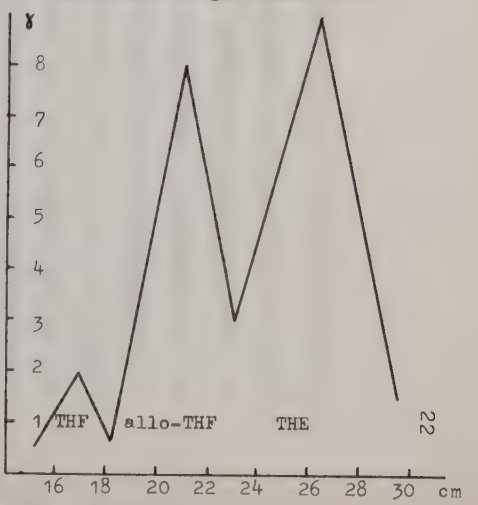
* angefärbte Vergleichsstreifen



C_{21}-Steroide



* angefärbte Vergleichsstreifen



IV. Ergebnisse

Folgende Steroide wurden in wechselnder Menge in den untersuchten Urinen identifiziert:

11-Oxy-C_{19}-Steroide:

11β-Hydroxyaetiocholanolon (11-OHÄ)	– 3α, 11β-Dihydroxy-5β-androstan-17-on
11β-Hydroxyandrosteron (11-OHA)	– 3α, 11β-Dihydroxy-5α-androstan-17-on
11-Ketoaetiocholanolon (11-OÄ)	– 3α-Hydroxy-5β-androstan-11,17-dion
11-Ketoandrosteron (11-OA)	– 3α-Hydroxy-5α-androstan-11,17-dion

11-Deoxy-C_{19}-Steroide:

Dehydroepiandrosteron (DHA)	– 3β-Hydroxyandrost-5-en-17-on
Aetiocholanolon (Aetio)	– 3α-Hydroxy-5β-androstan-17-on
Androsteron (Andro)	– 3α-Hydroxy-5α-androstan-17-on

C_{21}-Steroide:

Tetrahydrocortisol (THF)	– 3α, 11β, 17α, 21-Tetrahydroxy-5β-pregnan-20-on
allo-Tetrahydrocortisol (allo-THF)	– 3α, 11β, 17α, 21-Tetrahydroxy-5α-pregnan-20-on
Tetrahydrocortison (THE)	– 3α, 17α, 21-Trihydroxy-5β-pregnan-11,20-dion

Die quantitativen Daten sind in den Tabellen

Nr.1 = 11-Oxy-C_{19}-Steroide

Nr.2 = 11-Deoxy-C_{19}-Steroide

Nr.3 = C_{21}-Steroide

zusammengestellt.

Tabelle 1

11-Oxy-C_{19}-Steroide

		Zahl d. Kinder	%des Zimmermann-positiven Materials*	11-OHÄ**	11-OHA**	11-OÄ**	11-OA**	5α/5β+	E 1b / E 3b *
Gruppe 1 ♀ normaler Bilirubinspiegel (Mittelwerte)	a	6	16,7	3,1	2,8	8,5	7,7	0,9	0,29
	b	3	13,4	ø	ø	7,2	5,0	0,7	0,21
Gruppe 2 ♀ Hyperbilirubinaemie (Mittelwerte)	a	3	24,0	4,2	7,5	2,6	2,9	1,5	0,29
	b	3	14,6	3,1	6,0	8,9	9,0	1,3	0,40
Gruppe 3 ♂ normaler Bilirubinspiegel (Mittelwerte)	a	6	19,9	4,4	6,8	5,9	7,3	1,4	0,28
	b	6	12,2	1,4	2,2	3,2	4,1	1,3	0,35
Gruppe 4 ♂ Hyperbilirubinaemie (Mittelwerte)	a	6	14,8	3,2	4,2	8,0	2,3	0,6	0,11
	b	3	19,6	ø	22,1	18,1	25,0	0,3	0,25
Gruppe 5 ♀ reife Neugeborene ♂ (Mittelwerte)	a	2			Chromatogramm zerstört				
	b	2	14,0	2,5	2,5	8,0	3,5	0,5	1,1
Gruppe 6 ♀ ältere Säuglinge ♂ (Mittelwerte)	a	6	32,0	4,7	3,3	10,0	9,2	0,8	0,9
	b	6	14,0	1,5	1,7	10,3	3,0	0,4	ø

** Zahlenangaben in µg/24 Std./Kind

a = 3.-6. Lebenstag

b = 9.-14. Lebenstag

Gr.5a+b = 20.-21. Lebenstag

* Prozentwert der Summe der 11-Oxy-C_{19}-Steroide zur Summe des Zimmermann-pos.Materials nach Säulenchromatographie

ø = Steroid nicht nachgewiesen

Gr.6a+b = 1.-6.Lebensmonat

* $\frac{C_{19}\text{-Glucuronide}}{C_{19}\text{-Sulfate}}$

+ = $\frac{11\text{-OHA} + 11\text{-OA}}{11\text{-OHÄ} + 11\text{-OÄ}}$

Tabelle 2

11-Deoxy-C_{19}-Steroide

		Zahl d. Kinder	%des Zimmermann-positiven Materials*	DHA**	Aetio**	Andro**	5α/5β+	11-Deoxy / 11-Oxy
Gruppe 1 ♀ normaler Bilirubinspiegel (Mittelwerte)	a	6	15,2	3,7	3,4	13,0	3,9	0,9
	b	3	21,6	6,5	3,0	10,5	3,5	1,6
Gruppe 2 ♀ Hyperbilirubinaemie (Mittelwerte)	a	3	11,2	2,1	1,6	4,3	2,7	0,5
	b	3	10,3	7,5	2,0	9,3	4,6	0,7
Gruppe 3 ♂ normaler Bilirubinspiegel (Mittelwerte)	a	6	30,5	6,9	6,8	23,6	3,5	1,5
	b	6	27,1	7,4	5,3	9,0	1,7	1,8
Gruppe 4 ♂ Hyperbilirubinaemie (Mittelwerte)	a	6	37,0	12,3	3,8	28,2	7,4	0,3
	b	3	26,2	18,2	27,0	41,5	1,5	1,3
Gruppe 5 ♀ reife Neugeborene ♂ (Mittelwerte)	a	2			Chromatogramm zerstört			
	b	2	4,5	1,4	1,2	3,1	2,6	0,35
Gruppe 6 ♀ ältere Säuglinge ♂ (Mittelwerte)	a	6	15,0	Ø	5,5	5,3	1,0	0,4
	b	6	7,0	Ø	7,3	1,1	0,2	0,5

** Zahlenangaben in µg/24 Std./Kind

a = 3.-6. Lebenstag

b = 9.-14. Lebenstag

Gr.5a+b = 20.-21. Lebenstag

* Prozentwert der Summe der 11-Deoxy-C_{19}-Steroide zur Summe des Zimmermann-pos.Materials nach Säulenchromatographie

Ø = Steroid nicht nachgewiesen

Gr.6a+b = 1.-6. Lebensmonat

+ = Androsteron / Aetiocholanolon

Tabelle 3

C_{21}-Steroide

		Zahl d. Kinder	%des Porter-Silber-positiven Materials *	THF **	allo-THF **	THE **	%-allo-THF	allo-THF / THF	THF / THE
Gruppe 1 ♀ normaler Bilirubinspiegel (Mittelwerte)	a	6	36,8	3,1	6,3	7,8	36,5	2,0	0,39
	b	6	41,1	2,9	16,8	15,2	48,6	6,2	0,19
Gruppe 2 ♀ Hyperbilirubinaemie (Mittelwerte)	a	3	64,0	1,8	6,6	6,6	44,0	3,7	0,27
	b	3	65,0	4,8	24,6	29,2	41,8	5,1	0,16
Gruppe 3 ♂ normaler Bilirubinspiegel (Mittelwerte)	a	6	29,7	1,8	2,1	17,8	9,8	1,2	0,10
	b	6	31,0	2,5	4,9	29,8	13,1	2,0	0,08
Gruppe 4 ♂ Hyperbilirubinaemie (Mittelwerte)	a	6	29,2	2,2	10,5	8,8	49,0	4,9	0,25
	b	3	61,0	1,6	15,4	16,4	46,0	9,7	0,10
Gruppe 5 ♀ ♂ reife Neugeborene (Mittelwerte)	a	2	42,0	2,7	21,0	104,3	16,4	7,7	0,03
	b	2	63,0	7,0	27,0	125,0	17,0	3,8	0,06
Gruppe 6 ♀ ♂ ältere Säuglinge (Mittelwerte)	a	6	39,0	67,0	Ø	40,0			1,65
	b	6	30,0	17,4	Ø	70,0			0,25

** Zahlenangaben in µg/24 Std./Kind

* Prozentwert der Summe der C_{21}-Steroide zur Summe des Porter-Silber-pos. Materials nach Säulenchromatographie

Ø = Steroid nicht nachgewiesen

a = 3.-6. Lebenstag b = 9.-14. Lebenstag
Gr.5a+b = 20.-21. Lebenstag Gr.6a+b = 1.-6. Lebensmonat

11-Oxy-C_{19}-Steroide.

Der prozentuale Anteil der chromatographisch bestimmten 11-Oxy-C_{19}-Steroide an der Gesamtmenge der 17-Ketosteroide nach Säulenchromatographie lag bei Frühgeborenen zwischen 12,2 und 24 %. Bei reifen Neugeborenen betrug der Prozentsatz 14 % und bei älteren Säuglingen 14 bis 32 %. Zusammen mit den 11-Deoxy-C_{19}-Steroiden liegen die Prozentsätze der chromatographisch identifizierten C_{19}-Steroide bei Frühgeborenen zwischen 24,9 und 51,8 %, bei Reifgeborenen bei 18,5 % und bei älteren Säuglingen zwischen 21 und 47 %. Aus diesen Zahlen folgt, daß bei der 17-Ketosteroid-Gesamtbestimmung ein großer Anteil von unspezifischen Zimmermann-Chromogenen sowie noch unbekannte 17-Ketosteroide mitbestimmt werden.

Die einzelnen Metabolite der 11-Oxy-C_{19}-Steroide waren nur in geringen Mengen nachweisbar.

In den einzelnen Gruppen der weiblichen Frühgeborenen waren keine Unterschiede in der 11-Oxy-C_{19}-Steroidausscheidung nachweisbar.

Bis auf die Gruppe 1b, in der 11-OHÄ und 11-OHA fehlten, konnten bei weiblichen Frühgeborenen alle Metabolite der 11-Oxy-C_{19}-Steroide im Harn nachgewiesen werden.

Bei männlichen Frühgeborenen waren, bis auf das Fehlen von 11-OHÄ in der Gruppe 4b, ebenfalls alle 4 Metabolite der 11-Oxy-C_{19}-Steroide im Harn vorhanden.

Bei männlichen und weiblichen Frühgeborenen bestand kein Unterschied in der Steroidausscheidung zwischen normalen und ikterischen Frühgeborenen.

Der Quotient $\frac{C_{19}\text{-Glucuronide}}{C_{19}\text{-Sulfate}}$ $\frac{(E\ 1b)}{(E\ 3b)}$ zeigte, daß bei Frühgeborenen die Steroide überwiegend als Sulfate ausgeschieden werden. Der Quotient lag zwischen o,11 und o,4o, bei reifen Neugeborenen und älteren Säuglingen lag er zwischen o,9 und 1,1.

11-Deoxy-C_{19}-Steroide.

Der Prozentsatz der Summe der chromatographisch bestimmten 11-Deoxy-C_{19}-Steroide an dem Gesamt-17-Ketosteroidmaterial nach Säulenchromatographie lag bei Frühgeborenen zwischen 1o,3 und 37 %. Er war größer als der Wert von 4,5 % bei reifen Neugeborenen. Bei älteren Säuglingen betrug der Prozentsatz 7,o bis 15,o %. Frühgeborene scheinen mehr 11-Deoxy-C_{19}-Steroide auszuscheiden als Reifgeborene, was vor allem durch Vermehrung von DHA und Androsteron bedingt ist. Die Werte bei Frühgeborenen lagen deutlich höher als bei Reifgeborenen. Androsteron wurde von Frühgeborenen in 1,5 - 9 facher Menge verglichen mit Reifgeborenen ausgeschieden. Bei älteren Säuglingen war DHA nicht mehr nachweisbar. Der Quotient $\frac{11\text{-Deoxy}}{11\text{-Oxy}}$ war bei männlichen und weiblichen normalen Frühgeborenen höher als bei entsprechenden Kindern mit Hyperbilirubinämie.

Bei Früh- und Reifgeborenen fanden sich annähernd gleich hohe $5\alpha/5\beta$-Quotienten (Androsteron/Aetiocholanolon), wohingegen bei älteren Säuglingen der Quotient auf 1,o und darunter abfiel.

C_{21}-Steroide.

Der Prozentsatz der Summe der chromatographisch bestimmten C_{21}-Steroide an den Gesamt-Porter-Silber-

Chromogenen nach Säulenchromatographie lag bei Frühgeborenen zwischen 26,3 und 65 %. Bei Reifgeborenen betrug dieser Wert zwischen 42 und 63 %, bei älteren Säuglingen zwischen 3o und 39 %.

Bei weiblichen Frühgeborenen zeigten sich in den einzelnen Gruppen keine Unterschiede in der C_{21}-Steroidausscheidung.

Männliche Frühgeborene mit Hyperbilirubinämie wiesen eine deutlich höhere allo-THF-Ausscheidung auf als normale männliche Frühgeborene.

Bei älteren Säuglingen ließ sich allo-THF im Harn nicht mehr nachweisen.

Der im Gegensatz zu Früh- und Reifgeborenen hohe Quotient $\frac{THF}{THE}$ bei älteren Säuglingen zeigt, daß mit zunehmendem Lebensalter die THF-Ausscheidung kontinuierlich ansteigt.

V. D i s k u s s i o n

Unsere Untersuchungen über Steroidmuster im Urin bei Frühgeborenen mit Hyperbilirubinaemie im Vergleich zu normalen, alters- und geschlechtsmäßig entsprechenden Frühgeborenen ergaben keine Hinweise, die auf eine bei Hyperbilirubinaemie veränderte Steroidausscheidung schließen lassen. Ein gestörter Steroidstoffwechsel kann somit als Ursache der Hyperbilirubinaemie bei den von uns untersuchten Frühgeborenen kaum in Frage kommen, da sonst diese Frühgeborenen ein gegenüber der Norm verändertes Steroidmuster im Urin aufgewiesen hätten.
Bemerkenswert ist der erhebliche Unterschied zwischen der colorimetrisch erfaßten Steroidgesamtausscheidung und der Summe der chromatographisch aufgetrennten Steroidmetabolite. Man muß daraus folgern, daß eine größere Menge noch unbekannter Steroide im Harn ausgeschieden wird. Weiterhin kann es sich um unspezifische Chromogene handeln, die bei der Farbreaktion miterfaßt werden.
In der Literatur liegen nur vereinzelte Untersuchungen über das Muster der Harnsteroide bei Frühgeborenen vor. Im wesentlichen konnten wir die Ergebnisse anderer Autoren bestätigen.
Bei Frühgeborenen und -in geringerem Maße- auch bei reifen Neugeborenen besteht eine relative Unreife der Enzymsysteme zur Synthese der Nebennierenrindensteroide, besonders was die 3β-Hydroxysteroiddehydrogenase und die Δ^5-Δ^4-Isomerase anbetrifft. Es zeigte sich bei Frühgeborenen eine deutliche Ausscheidung von DHA, aber auch

bei reifen Neugeborenen konnte es in geringer Menge nachgewiesen werden. Bei älteren Säuglingen war DHA nicht mehr im Harn zu finden. Bildungsort des DHA ist der Palaeocortex, die Zone X, der Nebennierenrinde. Die Produktion des DHA dauert solange an, bis sich die Nebennierenrinde von der fetalen Struktur zur reifen Struktur der Drei-Teilung entwickelt hat. Während der Fetalzeit erfolgt die Sekretion des DHA unter dem Einfluß des plazentaren Choriongonadotropins, gegen Ende der Schwangerschaft überwiegt der Einfluß des hypophysären ACTH des Feten. Die höhere DHA-Ausscheidung bei Frühgeborenen gibt einen Hinweis auf die stärkere Unreife des Nebennierenrindensystems gegenüber den reifen Neugeborenen. Die von uns gefundenen Werte für DHA liegen wesentlich niedriger als die von LAURITZEN und LEHMANN (1962,1966) angegebenen Werte. Die Differenz kann durch den unterschiedlichen Aufarbeitungsvorgang erklärt werden (BIRCHALL et al, 1961, LAURITZEN und LEHMANN, 1966).

Bei Früh- und Reifgeborenen wurde mehr Androsteron als Aetiocholanolon im Harn ausgeschieden. Mit zunehmendem Lebensalter fiel der $5\alpha/5\beta$-Quotient ab.

Bei reifen Neugeborenen und älteren Säuglingen werden relativ mehr 11-Oxy-C_{19}-Steroide als 11-Deoxy-C_{19}-Steroide ausgeschieden, was sich in einem Abfall der Quotienten $\frac{\text{11-Deoxy}}{\text{11-Oxy}}$ äußert. Während der Pubertät nimmt der Quotient wieder zu entsprechend dem stärkeren Ansteigen der 11-Deoxy-C_{19}-Steroide im Vergleich zu den 11-Oxy-C_{19}-Steroiden. (PAULSEN and SOBEL, 1960, BEAS et al, 1962, TELLER, 1967)

In allen Gruppen der Frühgeborenen werden mehr tetrahydrierte Cortisonverbindungen als Cortisolverbindungen ausgeschieden. THF (Cortisolverbindung) läßt sich nur in ganz geringen Mengen nachweisen. Bei älteren Säuglingen ist ein starker Anstieg der THF-Ausscheidung zu beobachten.

Vor allem bei Frühgeborenen und in geringerem Maße auch bei reifen Neugeborenen läßt sich eine Substanz nachweisen, die chromatographisch weniger weit als THE wandert und phenylhydrazin-positiv ist. Wir nehmen an, daß es sich hierbei um allo-THF handelt. Eine genaue Identifizierung ist bisher noch nicht erfolgt. Bei Frühgeborenen wird allo-THF etwa in der gleichen Menge ausgeschieden wie THE, bei reifen Neugeborenen nur in etwa 1/5 der Menge von THE. Bei älteren Säuglingen ist allo-THF nicht mehr nachweisbar.

Männliche Frühgeborene mit Hyperbilirubinaemie weisen einen deutlich höheren allo-THF-Spiegel auf als normale männliche Frühgeborene. Bei weiblichen Frühgeborenen läßt sich kein Unterschied nachweisen. Ob der hohe allo-THF-Spiegel mit dem erhöhten Bilirubinspiegel in einem ursächlichen Zusammenhang steht, muß in weiteren Versuchen geklärt werden.

VI. Zusammenfassung

Es wurde die Steroidausscheidung im Harn von 24 Frühgeborenen, 4 reifen Neugeborenen und 12 älteren Säuglingen untersucht.

Die Einteilung der Kinder erfolgte in 6 Gruppen nach Alter und Geschlecht, ferner bei den Frühgeborenen in solche mit und ohne Hyperbilirubinaemie. Mit einer Methode, die aus Hydrolyse, Extraktion, Säulen- und Papierchromatographie besteht, wurden quantitativ folgende Steroide bestimmt:

11-Oxy-C_{19}-Steroide	- 11β -Hydroxyaetiocholanolon, 11β - Hydroxyandrosteron, 11-Ketoaetiocholanolon, 11-Ketoandrosteron.
11-Deoxy-C_{19}-Steroide	- Dehydroepiandrosteron, Aetiocholanolon, Androsteron.
C_{21}-Steroide	- Tetrahydrocortisol, allo-Tetrahydrocortisol, Tetrahydrocortison.

Ein statistisch nicht zu sichernder Einfluß des erhöhten Bilirubinspiegels auf die Steroidausscheidung konnte in zwei Punkten festgestellt werden: Depression der 11-Deoxy-C_{19}-Steroidausscheidung bei männlichen und weiblichen Frühgeborenen mit Hyperbilirubinaemie, das in einem gegenüber normalen Frühgeborenen erniedrigten $\frac{\text{11-Deoxy}}{\text{11-Oxy}}$ - Quotient zum Ausdruck kommt.

Weiterhin fand sich bei männlichen Frühgeborenen eine vermehrte Ausscheidung von allo-THF.

Bei Neugeborenen und in besonderem Maße bei Frühgeborenen werden die Steroide vorwiegend als Sulfatester ausgeschieden. Später überwiegt die Ausscheidung als Glucuronide.

Bei Frühgeborenen wurde eine hohe DHA-Ausscheidung festgestellt, die bei älteren Säuglingen nicht mehr nachweisbar war.

Androsteron wurde bei Früh- und Reifgeborenen in größerer Menge ausgeschieden als Aetiocholanolon. Bei älteren Säuglingen war das Verhältnis umgekehrt.

Im Gegensatz zu Frühgeborenen schieden reife Neugeborene und ältere Säuglinge weniger 11-Deoxy-C_{19}-Steroide als 11-Oxy-C_{19}-Steroide aus.

Bei Früh- und Reifgeborenen wurde eine Substanz nachgewiesen, die sich wie allo-THF verhielt. Eine genaue Identifizierung steht noch aus. Bei älteren Säuglingen war allo-THF nicht mehr nachweisbar.

VII. L i t e r a t u r

ARIAS, I.M., L.M. GARTNER, M. FURMAN and R. WOLFSON:
Effekt of several drugs and chemicals on hepatic Glucuronide formation.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 112: 1037 (1963)

ARIAS, I.M., L.M. GARTNER, S. SEIFTER and M. FURMAN: Prolonged neonatal unconjugated hyperbilirubinemia associated with breast-feeding and a steroid, pregnane-3α, 20β-diol, in maternal milk that inhibits glucuronide formation.
J. clin. Invest. 43: 2037 (1967)

ARIAS, I.M.: Neonatal unconjugated hyperbilirubinemia associated with breast-feeding and a faktor in milk that inhibits glucuronide formation in vitro.
J. clin. Invest: 42: 913 (1963)

ARIAS, I.M. and L.M. GARTNER: Production of unconjugated hyperbilirubinemia in full-term newborn infants following administration of pregnane-3α, 20β-diol.
Proc. Am. Ped. Soc. 74thmeeting, Seattle, 1964, S. 39
Nature 203: 1292 (1964)

BEAS, F., R.P. ZURBRÜGG, J. CARA and L.I. GARDNER: Urinary C_{19}-Steroids in normal children and adults.
J. clin. Endocrin. 22: 1090 (1962)

BIRCHALL, K., D.M. CATHRO and C.C. FORSYTH: Separation and estimation of adrenal steroids in the urin of newborn infants.
Lancet 1961/I, 26

BROWN, A.K., W.W. ZUELZER and H.H. BURNETT: Studies on the neonatal development of the glucuronide conjugating system.
J. clin. Invest. 37: 332 (1958)

CAREDDU, P., T. APPOLLONIO, L. PICENISERENI and F. SERENI: Corticoid hormones and conjugation of bilirubin in the fetus and newborn infant.
Min. Pediatrica 13: 227 (1961)

CAREDDU, P., F. SERENI and T. APPOLLONIO: Influence of ACTH and corticoids on the hepatic conjugation of bilirubin in the newborn. Clinical and experimental research. Min. Pediatrica 13: 453 (1961)

CATHRO, D.M., K.BIRCHALL, F.L. MITCHELL and C.C. FORSYTH: The excretion of neutral steroids in the urin of newborn infants.
J. Endocrin. 27: 53 (1963)

DRUCKER, W.D., A. SFIAKIS, A.J. BAROWSKI and N.P. CHRISTY: On the rate of formation of steroidal glucuronisides in patients with familiar and acquired jaundice.
J. clin. Invest. 43: 1952 (1964)

GARTNER, L.M.: Hormonelle Beziehungen zwischen Mutter und Kind mit besonderer Berücksichtigung der Frauenmilch.
Mschr. Kinderheilk. 115: 151 (1967)

HSIA, D.Y., R.M. DOWBEN, R. SHAW and D. GROSSMAN: Inhibition of Glucuronyl Transferase by progestational agents from serum of pregnant women.
Nature 187: 693 (1960)

HSIA, D.Y., R.M. DOWBEN and S. RIABOV: Inhibitors of Glucuronyl Transferase in Newborn.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 111: 326 (1963)

HSIA, D.Y., S. RIABOV and R.M. DOWBEN: Inhibition of Glucuronyl Transferase by steroid hormones.
Arch. Biochem. and Biophys. 103: 181 (1963)

HSIA, D.Y.: Bilirubin metabolism.
Ped. clin. of North Am. 12: 3 (1965)

JONES, B.: Glucuronyl Transferase inhibition by steroids.
J. Pediat. 64: 815 (1964)

KRAUER-MAYER, B., M. KELLER und A. HOTTINGER: Über den frauenmilchinduzierten Icterus prolongatus des Neugeborenen.
Helv. paed. acta 23: 68 (1968)

LATHE, G.H. and M. WALKER: The synthesis of Bilirubin glucuronid in animal and human liver.
Biochem. Journal 70: 705 (1958)

LATHE, G.H. and M. WALKER: The inhibitionary effekt of human pregnancy serum, neonatal serum and steroids on the conjugation of bilirubin by rat liver slices. Biochem. Journal 68: 6 P (1958)

LATHE, G.H. and F. HOLTON: Inhibitors of Bilirubin conjugation in newborn infant serum and Male urin. Clin. Science 25: 499 (1963)

LAURITZEN, Ch. und W.D. LEHMANN: Die Bedeutung der Steroidhormone für die Entstehung von Hyperbilirubinaemie und Ikterus neonatorum. Ztschr. f. Kinderheilk. 95: 143 (1966)

LAURITZEN, Ch. und W.D. LEHMANN: The Significance of Steroid hormones for the development of Hyperbilirubinemia and Icterus in the Newborn Infant. J. Endocrin. 39 Nr.2: 183 (1967)

LAURITZEN, Ch. und W.D. LEHMANN: Ausscheidung und Stoffwechsel von DHA beim Neugeborenen. Ztschr. Geburtsh. und Gyn. 165: 49 (1966)

LAURITZEN, Ch. und W.D. LEHMANN: Ausscheidung von DHA im Neugeborenenharn. Stimulierung durch Choriongonadotropin und ACTH. Arch. Gyn. 200: 699 (1962)

LAURITZEN, Ch., C.H.L. SHAKLETON and F.L. MITCHELL: The effekt of exogenous corticotropin on steroid excretion in the newborn. Acta Endocrin. 58: 655 (1968)

LEWI, S.: Breast feeding and Hyperbilirubinemia. Biol. neonat. 7: 294 (1964)

LUCEY, I.F.: Hyperbilirubinemia of prematurity. Pediatrics 25: 690 (1960)

MATSUMOTO, K., K. OKANO, T. UOZUMI and T. SEKI: Analysis of steroids in human urin by elution chromatography on cation-exchange resins with special reference to urinary steroids of newborn. Steroid dynamics, Proc. of the Symp. on the Dyn. of steroid hormones held in Tokyo May 1965

NEWMAN, A.J. and S. GROSS: Hyperbilirubinemia in breast-fed infants.
Pediatrics 32: 995 (1963)

PAULSEN, E.P. and E.H. SOBEL: Patterns of individual urinary C_{19}-Ketosteroids in children. Response to ACTH-stimulation.
Acta Endocrin. (Kbh) 35: Suppl. 51, 337 (1960)

PROUT, M. and A.H. SNAITH: Urinary excretion of 17-Keto-steroids in children.
Arch. Dis. childh. 33: 170 (1958)

RAURAMO, T., M. PULKKINEN and K.I.V. HARTIALA: The effekt of estradiol, Testosteron and Progesteron on Glucuronation in Bilches.
Ann. med. exp. et biol. Fenniae (Hels.) 41: 27 (1963)

RAURAMO, T. and M. PULKKINEN: The effekt of serum from pregnant and non-pregnant women on UDPGA-Transferase and the o-Aminophenol Glucuronide formation.
Ann. med. exp. et biol. Fenniae (Hels.) 41: 38 (1963)

ROSENFELD, R.S., I.M. ARIAS, L.M. GARTNER, L. HELLMAN and T.F. GALLAGHER: Studies of Urinary Pregnane-3α,20β-diol during Pregnancy, Post-partum, Lactation and Progesteron Ingestion.
J. clin. Endocrin. Metab. 27: 1705 (1967)

SALMI, T., A. PEKKARINEN and S. HEIKKILÄ: Excretion of the total 17-Hydroxycorticosteroids into the urin of newborn, prematures and infants (boys) during the first two days and the first month.
Ann. paed. Fenn. 3: 70 (1957)

SCHRÖTER, W.: Relation of free and masked Glucuronyl-Transferase during the postnatal period.
Vortrag Annual Meeting European Soc. f. Ped. Res. Manchester 1965

SILVERBERG, M., A. RAMOS and L. STERN: Effekt of pregnanediols on bilirubin metabolism in the newborn.
Proc. Soc. Ped. Res., 35th Meeting, Philadelphia, S.147 (1965)

SILVERBERG,M.: Neonatal idiopathic hyperbilirubinemia associated with breast-feeding.
Proc. Soc. Ped. Res. 34th Meeting, Seattle, S.120 (1964)

SILVERBERG, M., A. RAMOS and L. STERN: Pregnanediols and neonatal hyperbilirubinemia.
Am. J. Dis. Child. 111: 353 (1966)

STIEHM, E.R. and J. RYAN: Breast milk Jaundice.
Am. J. Dis. Child. 109: 212 (1965)

TELLER, W.M.: Die Ausscheidung von C_{19}-und C_{21}-Steroiden im Harn unter normalen und pathologischen Bedingungen der Entwicklung und Reifung.
Ztschr. ges. exper. Med. 142: 222 (1967)

THEILE, H. und K. BEYREISS: Neugeborenenhyperbilirubinaemie und Schwangerschaftsgestose. Untersuchungen über Bilirubinkonzentration im Nabelschnurblut und Ausscheidung von 17-Ketosteroiden bei Neugeborenen.
Ztschr. Kinderheilk. 95: 164 (1966)

YU, W.L. and R.A. ALDRICH: The Glucuronyl-Transferase system in the newborn infant.
Ped. clin. of N.America, 7: 381 (1960)

ZEISEL, H.: Chromatographie der Steroidhormone im Harn des Kindes.
5. Symp. der deutschen Ges. f. Endocrin.
7.-9. März 1957, S. 285

Lebenslauf.

Am 20.7.1940 wurde ich in Berlin als Sohn des technischen Telegraphen-Inspektors Wilhelm Zimmermann und seiner Ehefrau Sophie-Charlotte, geb. Becher, geboren.
Von Oktober 1946 bis März 1951 besuchte ich die Volksschule in Marburg/L. und nach bestandener Aufnahmeprüfung von April 1951 bis März 1960 das dortige Realgymnasium. Am 7. März 1960 bestand ich die Reifeprüfung.
Mein Studium begann ich im Mai 1960 an der Philipps-Universität in Marburg/L. Ich studierte zunächst zwei Semester Naturwissenschaften und wechselte dann unter Anrechung eines Semesters zum Medizinstudium über. Im Oktober 1961 bestand ich das Vorphysikum und im April 1963 das Physikum an der Philipps-Universität. Das Staatsexamen beendete ich am 7. März 1967 mit der Note "gut" ebenfalls an der Philipps-Universität.
Die Medizinalassistentenzeit begann ich im April 1967 an der Universitäts-Kinderklinik in Marburg/L. Ab September 1967 arbeitete ich 6 Monate auf der internen Abteilung und 8 Monate auf der chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Bad Hersfeld. Von November 1968 bis Ende Februar 1969 war ich auf der geb.-gyn. Abteilung des städtischen Krankenhauses Offenburg tätig. Die letzten 3 Monate der Medizinalassistentenzeit verbrachte ich auf der Anaesthesie-Abteilung des Kreiskrankenhauses Bad Hersfeld.
Die Bestallung als Arzt erhielt ich am 1. Juni 1969.
Seit dieser Zeit arbeite ich als Assistenz-Arzt auf der chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Bad Hersfeld.
Am 21. Juli 1969 legte ich mit Erfolg die mündliche Promotionsprüfung zum Dr. med. vor dem Prüfungsausschuß der medizinischen Fakultät der Philipps-Universität Marburg/L. ab.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten in Marburg:

Dimroth
Mahr
Walcher
Seidel
Drawert
Wendt
Hensel
Golenhofen
Brück
Hildebrandt
Bücher
Hohorst
Schultze
Niessing
Petry
Rohen
Mann
Hornung
Heuser
Schmid
Siegert
Bommer
Schleyer
Gedigk
Schölmerich
Martini
Marx
Löhr
Hamm
Lang

Hartmann
Sauer
Schwaiger
Rodeck
Maurath
Oehmig
Streicher
Huber
Würterle
Buchholz
Overbeck
Nocke
du Mesnil
Stender
Hess
Exner
Jacob
Grüter
Berendes
Beckmann
Straub
Neubauer
Linneweh
Dittrich
Teller
Oehme
Braun-Falco
Salfeld
Petzold